

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年10 月24 日 (24.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/083148 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/661, A61P 25/00, 25/16, 25/28, 43/00 (MUROFUSHI, Kimiko) [JP/JP]; 〒336-0026 埼玉県 さいたま市 辻 4-1 2-1 7 Saitama (JP). ティギーゲイバー (TIGYI, Gabor) [US/US]; 38111 テネシー州 メンフィス ウェイノカ アベニュー 3375 TN (US).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03658
- (22) 国際出願日: 2002 年4 月12 日 (12.04.2002) (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (30) 優先権データ: 特願2001-115925 2001 年4 月13 日 (13.04.2001) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ジェンコム (GENCOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都 町田市 南大谷 1 1 号 Tokyo (JP). 添付公開書類: 国際調査報告書
- (72) 発明者: および 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 室伏 きみ子

(54) Title: NERVE CELL SURVIVAL PROMOTERS CONTAINING CYCLIC PHOSPHATIDIC ACID DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 環状ホスファチジン酸誘導体を含む神経細胞の生存促進剤

(57) Abstract: It is intended to provide novel drugs which are useful in treating and/or preventing nerve disorders by enhancing the survival ratio of nerve cells or promoting the extension of nerve cells. Namely, drugs for promoting nerve cell survival which contain as the active ingredient a cyclic phosphatidic acid derivative having a cyclic phosphate structure at the glycerol sn-2- and 3-positions.

(57) 要約:

本発明の目的は、神経細胞の生存率の向上又は神経細胞の伸長の促進を通じて神経障害の治療及び／又は予防のために有用な新規な薬剤を提供することである。本発明によれば、グリセロール sn-2 位、3 位の環状リン酸構造を有する環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経細胞の生存促進のための薬剤が提供される。

WO 02/083148 A1

## 明細書

## 環状ホスファチジン酸誘導体を含む神経細胞の生存促進剤

## 技術分野

本発明は、リン脂質の1種である環状ホスファチジン酸誘導体を含む薬剤に関する。より詳細には、本発明は、環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経細胞の生存促進のための薬剤、神経細胞の伸長促進のための薬剤、並びに神経障害の治療及び／又は予防のための薬剤に関する。

## 背景技術

生体膜を構成している主成分であるグリセロリン脂質は、一般にグリセロール骨格に疎水性の脂肪酸が2分子結合し、さらにリン酸基を介してコリンやエタノールアミンなどの親水性基が結合している。リン脂質における疎水性部分と親水性部分とのバランスが、安定な脂質二重層を形成する上では重要である。これに対してリゾリン脂質は、脂肪酸が1分子のみ結合したものであり、疎水性部分が親水性基に対して相対的に小さくなるため、安定な膜構造をとれず、逆にそれを壊す界面活性作用を示す。

しかし、近年、低濃度で特有の生理活性を示すリゾリン脂質が多数見つかり、そのうちのひとつとしてリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)が挙げられる。LPAは最も単純な構造を持つリン脂質の一つであり、グリセロールのsn-1位あるいは2位の脂肪酸のどちらか一方が脱アシル化されている点でホスファチジン酸(phosphatidic acid; PA)とは相違する(図1を参照)。

LPAは、生体内にごく微量(細胞全リン脂質中の0.5%以下)しか存在しない。従来、LPAはリン脂質生合成の中間産物又は分解中間物と考えられていた。しかし、1970年代後半に、血漿中(Schumacher, K. A., 他, Thromb. Haemostas., 42, 631-640(1979))やダイズ粗レシチン画分中(Tokumura, A.; 他, Lipids, 13, 468-472(1978))に存在する血管収縮作用を示す物質がLPAであると同定された。

更に、血清中の脂質性増殖因子が LPA であることも示され (van Corven, E., 他, Cell 59, 45-54(1989))、LPA は生理活性脂質として注目されるようになった。

LPA には、細胞増殖促進作用 (Fischer D. J., 他, Mol Pharmacol, 54, 979-988 (1988))、癌細胞の浸潤促進 (Imamura, F., 他: Jpn. J. Cancer Res., 82, 493-496(1991) ; Imamura, F., 他: Biochem. Biophys. Res. Commun., 193, 497-503(1993) ; 及び Imamura, F., 他: Int. J. Cancer, 65, 627-632(1996))、アポトーシスの抑制 (Umnaky, S. R., 他: Cell Death Diff., 4, 608-616(1997)) などを含む多様な生理活性のあることが今までに明らかにされている。特に、神経細胞に対しても、LPA は神経突起の退縮を引き起こすことが知られている (Tigyi, G., 他: J. Biol. Chem., 267, 21360-21367(1992) ; Jalink, K., 他: Cell Growth & Differ., 4, 247-255(1994) ; Jalink, K., 他: J. Cell Biol., 126, 801-810(1994) ; 及び Tigyi, G., 他: J. Neurochem., 66, 537-548(1996))。また、神経系株化細胞である PC12 細胞では開口放出を誘導することも報告されている (Shiono, S., 他: Biochem. Biophys. Res Commun., 193, 663-667(1993))。さらに、1996 年に Chun らによって神経上皮細胞層 (ventricular zone, vz) に特異的に発現する G タンパク質関連受容体遺伝子 (ventricular zone gene-1 ; vzg-1/edg-2) がクローニングされ、当該遺伝子を過剰発現させた細胞の形態変化に血清中の脂質が必要であるという知見から、その特異的リガンドが LPA であることが明らかにされた (Hecht, J. H., 他: J. Cell Biol. 135, 1071-1083(1996))。これらの知見は、神経系における LPA シグナリングの重要性を示唆しており、神経の発生や分化において LPA が重要な役割を演じていると考えられる。

一方、本発明者らは、以前より真性粘菌 *Physarum polycephalum* を実験材料として、様々な細胞生化学的解析を行っている。真性粘菌は、外部環境の変化に応じて、形態変化を示し、その増殖・分化に伴って、生体膜脂質の組成と代謝に著しい変化を見せることが明らかにされてきた。1992 年に単相体ミクソアメーバから単離・同定された新規の脂質成分は、構造解析の結果、グリセロール骨格の sn-1 位にシクロプロパン環を含むヘキサデカン酸を持ち、sn-2 位と 3 位にリン酸が環

状にエステル結合をしている物質であると確認された (Murakami-Murofushi, K., 他: J. Biol. Chem., 267, 21512-21517(1992))。この物質は、*Physarum* 由来の LPA 類似体であることから、PHYLPA と命名された (図 2 を参照)。

PHYLPA は、真核細胞の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制した脂質画分より得られたものであり、PHYLPA がこれらの生理活性を示すことが確認されている。PHYLPA は特徴的な脂肪酸を有しているが、この脂肪酸部分を別の一般的な脂肪酸に置換した構造類似体を有機合成し、それらの生理活性を調べた結果、PHYLPA と同様の生理作用が示された (Murakami-Murofushi, K., 他: Biochem. Biophys. Acta, 1258, 57-60(1995))。このことより、これらの生理作用に重要な構造はグリセロール sn-2 位、3 位の環状リン酸構造にあると推測される。この構造を持つ脂質は、総称して環状ホスファチジン酸 (cyclic phosphatidic acid; cPA) と称される (図 2 を参照)。

cPA は真性粘菌特有の脂質ではなく、広く生物界に存在していることが確認された。例えば、ヒト血清アルブミン結合脂質より、脂肪酸部分にパルミチン酸 (C16:0) を有する cPA が単離・同定され、ミリスチン酸 (C14:0) 及びステアリン酸 (C18:0) が結合した cPA も少量存在することが示唆された。血清中の cPA の濃度は約  $10^{-7}$  M と予想され、これは LPA の血清中濃度の約  $1/10$  に相当する (Kobayashi, T., 他: Life Science, 65, 2185-2191(1999))。その後、LPA と同様にヒト血清中やウサギ涙腺液中にも cPA が存在することが確認された (Liljöm, K., 他: Am. J. Physiol., 274, C1065-1074(1998))。

cPA の作用についても、LPA と相反又は類似する生理活性を示すことが報告されている。例えば、細胞増殖の抑制 (Murakami-Murofushi, K., 他: Cell Struct. Funct., 18, 363-370(1993))、癌細胞の浸潤抑制 (Mukai, M. 他: Int. J. Cancer, 81, 918-922 (1999))、および細胞内ストレスファイバーの形成 (Fischer, D. J., 他: Mol. Pharmacol., 54, 979-988(1998)) などが報告されている。

ところで、神経細胞は、神経栄養因子 (nerve growth factor; NGF) の供給を遮断すると生存できないことが知られており、例えば、海馬では高濃度の NGF が

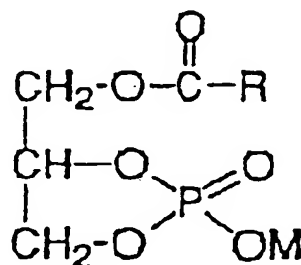
存在する（畠中寛：蛋白質核酸酵素，35，103-117，1989）。また、NGF 様の細胞成長因子である繊維芽細胞成長因子（fibroblast growth factor ; FGF）が、海馬の神経細胞の生存率を高め、神経突起の伸長を促進するとの報告もある（畠中寛：生化学，61，1351-1365，1989）。しかしながら、cPA が神経細胞に及ぼす作用についてはこれまで報告がなされていない。

#### 発明の開示

本発明は、cPA の新しい生理活性の一つとして神経細胞への作用を解明し、神経細胞の生存率の向上又は神経細胞の伸長の促進を通じて神経障害の治療及び／又は予防のために有用な新規な薬剤を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、cPA の生合成の機構の解明を試み、次いで、ウシ脳中における cPA の検出を試みた。そして、ラット胎児脳由来の初代培養系を用いて、cPA が神経細胞の生存や神経突起の形成に及ぼす影響について解析した。これらの解析の結果、本発明者らは、cPA がラット海馬初代培養神経系細胞の生存率を高め、神経突起の伸長を促進することを明らかにすることにより、cPA が神経障害の治療に有用な治療剤となり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、一般式(I)：



（式中、Rは、炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。）

で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経細胞の生存促進のための薬剤が提供される。

本発明の別の側面によれば、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経細胞の伸長促進のための薬剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経障害の治療及び／又は予防のための薬剤が提供される。

神経障害は、例えば、痴呆、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン氏病、脳卒中、脳梗塞または頭部外傷から選択される。本発明で用いる一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体は好ましくは1-オレオイル環状ホスファチジン酸である。

本発明のさらに別の側面によれば、

治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、神経細胞の生存を促進する方法；

治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、神経細胞の伸長を促進する方法；並びに、

治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、神経障害の治療及び／又は予防する方法；が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、

上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、神経細胞の生存促進のための薬剤の製造における使用；

上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、神経細胞の伸長促進のための薬剤の製造における使用；

並びに、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、神経障害の治療及び／又は予防のための薬剤の製造における使用；が提供される。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、ホスファチジン酸 (PA) とリゾホスファチジン酸 (LPA) の構造を示す図である。

図 2 は、リゾリン脂質の構造を示す図である。A は 1-アシル LPA、B は PHYLPA、C は 1-アシル cPA を示す。

図 3 は、ウシ大脳からの脂質成分の抽出法の概要を示す図である。

図 4 は、薄層クロマトグラフィー (TLC) による cPA の精製法を示す図である。

図 5 は、ウシ大脳由来部分精製物の TLC 分析結果を示す図である。鉛筆で囲んだ部分はプリムリン試薬で検出された領域を示す。(a) は抽出物中の cPA の検出を示し、(b) は抽出物中の cPA 濃度の決定を示す。

図 6 は、BSA (a)、cPA (b) 又は NGF (c) の添加 48 時間後の神経細胞の様子を示す図である。

図 7 は、cPA の神経細胞密度に対する影響を示すグラフである。(a) は細胞密度と生存率の関係を示し、(b) は最適細胞密度の決定を示す。

図 8 は、cPA の神経細胞の生存率に対する影響を示すグラフである。

図 9 は、細胞生存率の上昇に最適な cPA 濃度を決定するためのデータとしての神経細胞を示す図である。

図 10 は、cPA の神経突起伸長に対する影響を示すグラフである。縦軸は、24 時間 (a)、または 12 時間 (b) 後のコントロール神経細胞の長さを 1 とし、それに対する比で表した。

図 11 は、cPA 濃度と神経突起を有する細胞の割合を示すグラフである。

図 12 は、神経突起伸長と cPA 濃度との関係を示す神経細胞の図である。

図 13 は、cPA による生存率上昇作用に対する PI3K 阻害剤の影響を示すグラフである。Wortmannin (30 nM)、LY294002 (10  $\mu$ M)、cPA (1  $\mu$ M)

発明を実施するための最良の形態

置換基Rが示す炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペンタデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘプタデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジイニル基などが挙げられる。

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプロリジン環などが挙げられる。

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9-メタノペンタデシル基などが挙げられる。

置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸(cPA)誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

本発明で用いられる一般式(I)で示される cPA の具体例としては、オレオイル cPA が特に好ましい。

一般式(I)で示される cPA 誘導体は、例えば、特開平5-230088号公報、特開平7-149772号公報、特開平7-258278号公報、特開平9-25235号公報に記載の方法等に準じて化学的に合成することができる。

あるいは、一般式(I)で示される cPA 誘導体は、特願平11-367032号明細書に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼDを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼDを作用しうるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼDとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものや *Streptomyces chromofuscus*, *Actinomadula sp.* などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、*Actinomadula sp.* No. 362 由来の酵素によって極めて選択的に cPA が合成される (特開平11-367032号明細書)。リゾ型リン脂質とホスホリパーゼDとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液 (pH 5~6 程度) 中で室温から加温下 (好ましくは37℃程度) で1から5時間程度反応させることにより行う。生成した cPA 誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC) などにより精製することができる。

本発明において有効成分として用いる環状ホスファチジン酸誘導体は、神経細胞の生存率を向上させ、また神経細胞の伸長を促進することができる。従って、本発明によれば、当該環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む神経障害の治療及び/又は予防のための薬剤が提供される。本明細書で言う神経障害とは好ましくは脳神経障害であり、その具体例としては、神経変性疾患、脳卒中、脳梗塞、痴呆、頭部外傷などが挙げられる。ここで言う神経変性疾患とは、神経

細胞が萎縮又は変性脱落する病気であり、例えば、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン氏病等が挙げられる。

本発明の薬剤は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である一般式(I)で示される cPA 誘導体とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

本発明の薬剤は、種々の形態で投与することができるが、主な作用部位が脳であるため、血液-脳関門を通過できる形態であることが好ましい。そのような好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

本発明の薬剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH 調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；

ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等の pH 調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

本発明の薬剤はヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

本発明の薬剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  から  $1,000 \text{ mg}/\text{kg}$  程度の範囲であり、好ましくは  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  から  $100 \text{ mg}/\text{kg}$  程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

本発明の薬剤は、神経障害の治療又は予防に有効な他の薬剤、脳神経にエネルギーを供給するような栄養剤等と併用することもできる。

なお、cPA それ自体は、後記する実施例 1 及び 2 の結果から明らかなように哺乳類の脳に存在する物質であり、生体にとって安全であると考えられる。

本出願の優先権主張の基礎となる出願である特願 2001-115925 号の明細書に開示した内容は全て引用により本明細書に開示したものとする。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

## 実施例

### 実施例 1：ホスホリパーゼ D (PLD) による cPA の生成

実施例 1 では、放線菌由来 PLD を用いてリゾホスファチジルコリン (LPC) から cPA を生成できること、並びに哺乳類の脳中に cPA を生成する酵素が存在するこ

とを明らかにした。

#### (A) 材料及び方法

##### (A-1) 実験材料

放線菌 Streptomyces chromofuscus (*S. chromofuscus*) 由来の PLD、キャベツ由来の PLD は、Sigma 社より購入した。Actinomadura sp. No. 362 (*A. sp.* No. 362) 由来の PLD は、名糖産業より購入した。1-オレオイル LPC (1-oleoyl LPC)、リゾホスファチジルセリン (lysophosphatidylserine; LPS) は、Avanti Polar lipid, INC. 社より購入し、リゾホスファチジルエタノールアミン (lysophosphatidylethanolamine; LPE) は、Doosan Serdary Res. Lad. 社より、1-アルキルリゾホスファチジルコリン (1-alkyl lysophosphatidylcholine; 1-alkyl LPC)、1-アルケニルホスファチジルコリン・プラズマロゲン (1-alkenyl phosphatidylcholine plasmalogen; 1-alkenyl LPC) は、Sigma 社より購入した。また、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050 (1993) に記載の方法に準じて有機合成したオレオイル cPA (oleoyl cPA) も使用した。

##### (A-2) 1-NBD-LPC の合成

cPA 生成活性測定の為の基質として、蛍光標識された LPC の調製を行った。すなわち、1-ヘキサデカノイル-2-(1,2-(7-ニトロベンゾ-2-オキサー-1,3-ジアゾール-4-イル))-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (2-NBD-HPC; Avanti Polar lipids, INC. 社製) を出発原料とし、リパーゼ (Rhizopus delemere 由来; 生化学工業社製) で 1 位の脂肪酸のみを脱アシル化した後、トリス塩酸バッファー (pH=9) 中で、2 位の蛍光アシル基を 1 位に転位させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製したものを 1-NBD-LPC とした。

##### (A-3) cPA 生成活性測定

基質として、1-NBD-LPC と卵黄由来の LPC を 1:99 で混ぜ合わせたものを使用し

とを明らかにした。

## (A) 材料及び方法

### (A-1) 実験材料

放線菌 *Streptomyces chromofuscus* (*S. chromofuscus*) 由来の PLD、キャベツ由来の PLD は、Sigma 社より購入した。 *Actinomadura sp.* No. 362 (*A. sp.* No. 362) 由来の PLD は、名糖産業より購入した。 1-オレオイル LPC (1-oleoyl LPC)、リゾホスファチジルセリン (lysophosphatidylserine; LPS) は、Avanti Polar lipid, INC. 社より購入し、リゾホスファチジリエタノールアミン (lysophosphatidylethanolamine; LPE) は、Doosan Serdary Res. Lad. 社より、1-アルキルリゾホスファチジルコリン (1-alkyl lysophosphatidylcholine; 1-alkyl LPC)、1-アルケニルホスファチジルコリン・プラズマロゲン (1-alkenyl phosphatidylcholine plasmalogen; 1-alkenyl LPC) は、Sigma 社より購入した。 また、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050 (1993) に記載の方法に準じて有機合成したオレオイル cPA (oleoyl cPA) も使用した。

### (A-2) 1-NBD-LPC の合成

cPA 生成活性測定の為の基質として、蛍光標識された LPC の調製を行った。すなわち、1-ヘキサデカノイル-2- (1,2- (7-ニトロベンズ-2-オキサー-1,3-ジアゾール-4-イル)) -sn-グリセロール-3-ホスホコリン (2-NBD-HPC; Avanti Polar lipids, INC. 社製) を出発原料とし、リパーゼ (*Rhizopus delemere* 由来; 生化学工業社製) で 1 位の脂肪酸のみを脱アシル化した後、トリス塩酸バッファー (pH=9) 中で、2 位の蛍光アシル基を 1 位に転位させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製したものを 1-NBD-LPC とした。

### (A-3) cPA 生成活性測定

基質として、1-NBD-LPC と卵黄由来の LPC を 1:99 で混ぜ合わせたものを使用し

た(1% NBD-LPC)。100  $\mu$ M 1%NBD-LPC 存在下、10mM 塩化カルシウムを含む 100 mM 酢酸バッファー(pH=5.6)中で酵素アッセイを行った。酵素源として、放線菌 *S. chromofuscus* 由来の PLD2. 2  $\mu$ g/ml、または、放線菌 *A. sp.* No. 362 由来の PLD1. 4  $\mu$ g/ml を用いた。反応は 30°C (*S. chromofuscus* の場合)または、37°C (*A. sp.* No. 362 の場合)で行った。反応終了時に反応液の 0.3 倍容の 0.1M クエン酸を加えて、溶液を酸性にした後に、クロロホルム:メタノール(2:1)混液を反応液の 5.4 倍量加え、遠心(1,400 $\times$ g、5 分)して下層に、脂質を抽出した。もう一度、クロロホルム:メタノール(2:1)混液抽出操作を同様に繰り返した後に、下層を合わせて窒素気流下で濃縮・乾固させた。得られた脂質を少量のクロロホルム:メタノール(2:1)混液に再溶解させて、シリカゲル (Silica Gel) 60F 薄層クロマトグラフィープレート (TLC; E. Merck 社製)にスポットし、展開溶媒;クロロホルム/メタノール/酢酸/5%二亜硫酸ナトリウム水溶液(100:40:12:5)で脂質を分離し、各蛍光スポットの強さを、蛍光イメージ分析器 (fluoroimage analyzer) FLA-2000(富士フィルム社製)で定量分析した。

#### (A-4) ESI-MS/MS による構造解析

エレクトロスプレー型イオン源をタンデム四重極型質量分析計に装備したクアットロ II (Quattro II; Micromass 社製)と HPLC を連結した装置を使用して、陰イオンモードで分析した。ヒューレットパッカードモデル (Hewlett Packard model) 1050 HPLC ポンプ (Hewlett Packard 社製)を用いて、アセトニトリル/メタノール(1:1)混液により 5  $\mu$ l/分の流速で溶出した。サンプルは、0.1%ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル/メタノール(1:1)混液中に 10~50pmol/ $\mu$ l の濃度になるように脂質を溶かしたものを、3~5  $\mu$ l 注入した。ギ酸とアンモニアは、サンプルがイオン化される時に、それぞれプロトンの供与体、受容体として働く。HPLC と MS のインターフェイスは 80°C に維持し、溶媒を蒸発させる窒素ガスは圧力 40psi、流速 0.4 l/分に設定した。MS 分析において cone voltage-30eV で分子イオンを、MS/MS 分析において cone voltage-90eV で脂肪酸を、-170eV

でリン酸をモニターした。MS/MS 分析の際には、不活性ガスを導入して局部的に高圧な部位を作り、分子イオンを衝突活性開裂 (collision induced dissociation; CID) させてドーターイオンを発生させる手法を組み合わせた。衝突ガス (collision gas) にはアルゴン (圧力  $3.0 \sim 4.5 \times 10^{-4}$  Torr) を用い、衝突エネルギー (collision energy) は  $-50\text{eV}$  に設定した。

#### (A-5) NIH-3T3 における各種リゾリン脂質の添加によるストレスファイバーの形成

マウス由来繊維芽細胞 NIH-3T3 は、10% のウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS; Moregate 社製) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbeco's Modified Eagle's Medium; DMEM) で培養しているものを実験に用いた。NIH-3T3 を 22mm 径のカバーガラスを敷き詰めたシャーレ (10cm 径) 中に  $2.5 \times 10^4$  細胞で植え継ぎ、24 時間後に FBS を含まない培地に変え、その後 48 時間血清飢餓状態で培養した。10  $\mu\text{M}$  のリゾリン脂質を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、30 分間インキュベートすることで細胞に刺激を与えた後に、3.7% パラホルムアルデヒドと 0.1% トリトン (Triton) X-100 を含むダルベッコの PBS (Dalbecco's PBS) で室温にて、10 分間固定した。その後、5 単位/ml のローダミンファロイジン (rhodamine phalloidin; フナコシ社製) で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間染色した。カバーガラスを PBS で 3 回洗浄した後に、共焦点レーザー顕微鏡 TCS NT レーザー制御走査型顕微鏡 (Control Laser Scanning Microscope; Leica 社製) で観察した。

#### (A-6) ラット脳中の cPA 生成活性の測定

材料として、雄 4 週齢のスプラグドーレイ系ラット (Sprague-Dawley rat) を用いた。ラットはエーテル麻酔をかけた後、断頭し、全脳を摘出し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。保存してあったラット全脳の左右いずれかの半分 (約 0.8g) に、10 倍量の 0.32M ショ糖液を加え、ポリトロンホモジナイザー (Polytron Homogenizer; Polytron 社製)、パワーコントロール (power control) 7 で、20 秒間 2 回ホモジ

ナイズした。この液の体積の2倍量のヘプスバッファー (Hepes buffer) を加え、ホモジネート溶液とした。cPA 生成活性の測定は、以下の溶液組成で行った。すなわち、基質として 1%NBD-LPC 40nmol または、1 位脂肪酸のカルボキシル基の炭素を放射標識した  $^{14}\text{C}$ -LPC と非標識の LPC を 2:55 の比率で混ぜたもの (120nCi) を用い、オレイン酸ナトリウム 450  $\mu\text{M}$  存在下のホモジネート溶液 100  $\mu\text{l}$  中 37°C で反応させた。反応終了後の処理については、放線菌 PLD アッセイの条件に準じた。

## (B) 結果

### (B-1) 放線菌 PLD による LPA/cPA の生成

1%1-NBD-LPC を基質として、リン酸基転位活性の強弱の異なる 2 種類の放線菌由来の PLD を用いて cPA の生成が見られるか否かを検討した。*S. chromofuscus* 由来の PLD を用いた場合、20 分間反応させると、主な生成物として 1-NBD-LPA のみを得られた。しかし、リン酸基転移活性が高いとされている *A. sp. 362* 由来の PLD を用いると、LPA とは異なった生成物が主に得られ、この化合物の  $R_f$  値は、有機合成した cPA 標品 (オレオイル cPA) と一致した。これらの反応の違いを確認するため、それぞれの酵素の濃度依存性、さらに反応の時間依存性を検討した。*S. chromofuscus* 由来の PLD を用いた場合は、基質である LPC が減少するのに伴って、LPA の生成のみが見られた。それに対し、*A. sp. 362* 由来の PLD を用いた場合には、cPA に相当する生成物の増加が見られたのみで、LPA の生成はほとんど見られなかった。このことは、PLD の種類によって、基質が同じであっても生成物が異なることを示している。また、酵素学的解析の進んでいるキャベツ由来の PLD を用いたときには、LPA と cPA の両方が約 6:4 の割合で生成した。

ここで、cPA 相当の化合物を生成する *A. sp. 362* 由来の酵素について、さらに基質特異性を調べてみた。基質として各 100  $\mu\text{M}$  の 1-acyl LPC、1-alkyl LPC、1-alkenyl LPC、LPS、LPE を用い、標準的な PLD アッセイ条件に準じて反応を行わせた。それぞれの基質からの生成物を TLC を用いて分離し、LPA、cPA 相当のスポットをかきとり、リン定量を行って、生成量を測定した。いずれの基質におい

でも LPA の生成はほとんど見られなかった。LPC、1-alkyl LPC、あるいは 1-alkenyl LPC を基質として用いた場合には、時間依存的に cPA が生成したが、LPS、LPE を基質として用いた場合には cPA は生成されなかった。この結果より、*A. sp.* 362 由来 PLD は、極性基部分にコリン (choline) を有するリゾリン脂質から効率よく cPA を生成することが示された。また、alkyl、alkenyl 型 LPC も cPA 生成の基質になりうることがわかった。

#### (B-2) *A. sp.* 362 由来 PLD 反応生成物の構造解析

1 位脂肪酸にオレイン酸を持つ 1-oleoyl LPC を基質として *A. sp.* 362 由来 PLD で反応させたときの主生成物 (cPA と同じ Rf 値を持つ化合物) について、その構造解析を行う為、質量分析を用いた。まず、質量分析の条件を設定するため、スタンダードとして有機合成した 1-oleoyl cPA を ESI-MS/MS にかけて、陰イオンモードで分析した。その結果、上記した条件で、1-oleoyl cPA の分子イオン  $[M-H]^-$  に合致する  $m/z$  417 のピークが観察された。同一条件下で PLD 反応生成物について分析したところ、同様に  $m/z$  417 のピークが強く観察された。分子イオンに相当するピーク群について、さらに構造情報を得るため、in-source fragmentation によるタンデムマススペクトリー (MS/MS) を行った。スタンダード cPA の分子イオン  $m/z$  417 を親イオンとしたドータースキャンの結果、いくつかの特徴的イオンピークが発生し、以下のように解釈された。すなわち、 $m/z$  281 は  $C_{17}H_{33}COO^-$ 、 $m/z$  153 は  $[M-C_{17}H_{33}CO]^-$ 、 $m/z$  79 は  $PO_3^-$  に相当する。一方、PLD 反応によって得られた  $m/z$  417 ピークについて同様に MS/MS 分析をした結果、同一の特徴的なフラグメントピーク群が認められた。以上より、*A. sp.* 362 由来 PLD 反応によって作られた化合物が cPA であることが確認された。

#### (B-3) PLD 反応生成物による NIH-3T3 細胞でのストレスファイバーの形成

放線菌 *A. sp.* 362 由来 PLD 反応で得られた生成物が cPA と同一の化合物であることを更に確認するために、その生物活性を検討した。すなわち、cPA の持つ生理

活性の1つである、繊維芽細胞でのアクチンストレスファイバーの形成能を調べた。血清飢餓状態にしたサブコンフルエント (subconfluent) 状態の、マウス由来繊維芽細胞株である NIH-3T3 に  $10\mu\text{M}$  の LPA、化学合成された PHYLPA、あるいは PLD 反応生成物である cPA をそれぞれ  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間与え、ローダミンファロイジンでアクチンのストレスファイバーを染色し、観察を行った。脂質を添加しなかったコントロールの細胞では、ストレスファイバーの生成が見られなかったのに対し、用いた3種のリゾリン脂質でいずれもストレスファイバーの形成が見られた。

#### (B-4) ラット脳における cPA の生成

ラット脳中に cPA 生成活性があるか否かを検討した。異なる複数の条件下で検討を行った結果、最終的にショ糖水溶液 ( $0.32\text{M}$ ) でホモジネートを作成し、 $20\text{mM}$  ヘペスバッファー ( $\text{pH } 7.2$ ) 中、オレイン酸 ( $450\mu\text{M}$ ) 存在下で活性の測定を行ったところ、 $37^\circ\text{C}$  で 60 分間インキュベーション後、cPA 相当のスポットが確認された。

#### (C) まとめ

上記結果より、PLD と総称されるリン脂質加水分解酵素のうちの特定の酵素によって cPA を生成できることが示された。現在精製品として市販されている PLD の中でも、その酵素源が異なると、LPC を基質にした場合、異なる生成物が得られることがわかった。

実施例 1 において、ラット脳ホモジネート中に LPC から cPA を生成する酵素活性が検出できたことは、ホスファチジル基転移反応が、生理活性脂質である cPA の産出に積極的に貢献していることを示している。哺乳類の脳の中には、cPA が存在することが示され、また、PLD 活性についても脳は比較的高い活性を有することが分かった。基質の LPC は、通常の生理活性条件下では脳内にほとんど検出されないが、ある種の  $\text{PLA}_2$  の活性化を経て生成されると考えられる。

放線菌 *A. sp.* 362 由来 PLD を用いることにより、効率よく cPA が調製できること

は cPA の構造類似体を作成する上で有用である。このような酵素を用いた調製法では、1-alkenyl LPC から cPA を調製することが可能である。1-alkenyl LPA はウサギ角膜損傷時に検出され、細胞増殖活性を有し、創傷の治癒に関与していることが考えられている。この他、脂肪酸の異なった LPC から、対応する LPA/cPA を調製することが可能である。

## 実施例 2 : ウシ大脳からの環状ホスファチジン酸の検出

実施例 2 では、哺乳動物の脳中の cPA の検出を目的として、ウシの大脳に cPA が存在することを確認した。

### (A) 材料及び方法

#### (A-1) 実験材料

標準品として用いた oleoyl-cPA(有機合成品)は、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050(1993)に記載の方法に準じて有機合成した。ウシ脳は東京芝浦臓器株式会社より購入した。

#### (A-2) ウシ脳からの脂質成分の抽出

ウシの大脳を出発材料として、cPA の存在を確かめた。図 3 にその手順をまとめた。すなわち、ウシ大脳の一部 40g に、水 160ml、クロロホルム・メタノール混液(2:1)800ml を加え、ホモジナイズした後、分液漏斗に移し、攪拌後室温で静置した後、下層(クロロホルム層)を分取し、残りの上・中間層をクロロホルム・メタノール混液(17:3)(v/v)560ml で 4 回抽出し、下層を分取した。その後、上・中間層にメタノール 80ml、1M クエン酸を加えて、pH を約 3 に合わせ、そのまま攪拌しながら 30 分間放置した。さらに、クロロホルム・メタノール混液(17:3)560ml を加え、3 回抽出し、下層を分取した。得られたクロロホルム層をすべて合わせ、pH7 になるようにクロロホルム・メタノール・3%アンモニア水(6:5:1)で中和した後、窒素エバポレーターで乾固させた。この抽出物をクロロホルム・メタノール混液(1:1)に再懸濁し、脂質画分として以下の精製に用いた。

### (A-3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による精製

ウシ大脳由来の脂質抽出物を、次の展開溶媒系を用いた薄層クロマトグラフィーによって順次分離した (図 4)。分離にはシリカゲル 60 TLC プレート (E. Merck No. 5745 ; E. Merck 社製) を用いた。

I : クロロホルム / メタノール / 7M アンモニア水 (12 : 12 : 1) (v/v)

II : クロロホルム / メタノール / 酢酸 / 水 (25 : 15 : 4 : 2) (v/v)

スタンダードとして、有機合成した oleoyl-cPA をプレートの端にのせ、展開後スタンダード部分のみをリン特異的呈色試薬であるディットマー (Dittmer) 試薬で発色させた。抽出物をのせた部分のプレートについて、スタンダードの R<sub>f</sub> 値に相当する領域をかきとった。シリカ粉末から脂質をクロロホルム・メタノール混液 (1 : 2)、(1 : 1)、(2 : 1) の順でそれぞれの溶媒を用いて 2 回ずつ抽出した。抽出溶液を合わせて、窒素ガスで溶媒を除去した。これをクロロホルム・メタノール (1 : 1) に再懸濁し、シリカゲルを除いた後、この精製標品を次の展開溶媒を用いた二次元 TLC で分析した。分離にはシリカゲル 60 TLC プレート (E. Merck No. 5721 ; E. Merck 社製) を用いた。

III : クロロホルム / メタノール / 水 (60 : 40 : 9)

IV : クロロホルム / メタノール / 酢酸 / アセトン / 水 (10 : 2 : 2 : 4 : 1)

プレート上の脂質の呈色には、脂質全般を発色するプリムリン試薬を噴霧した後、UV ランプで蛍光スポットを検出し、鉛筆で印をつけた。その後、ディットマー試薬を噴霧してリン脂質を含むスポットを検出し、定量した。

### (B) 結果

精製は湿重量 40g のウシ大脳より開始した。クロロホルム・メタノール混液で抽出を繰り返したところ、6.95g 相当の粗脂質画分が抽出された。この抽出物 1g をクロロホルム・メタノール混液 (1 : 1) 2ml に溶解後、その 1ml を厚さ 2mm の TLC プレートにスポットした。TLC は、上記展開溶媒系 I、II を順次用いて、それぞ

れ Rf 値が 0.80~0.98、0.74~0.85 の範囲をかきとった。この部分精製サンプルを、上記展開溶媒系 III、IV を用いて二次元 TLC で分析したところ、スタンダード cPA と同一の Rf 値を示すスポットが確認された (図 5 (a))。

次に、上記展開溶媒系 III を用いた TLC によって、リン脂質特異的呈色試薬であるディットマー試薬による発色を、既知量のスタンダード cPA を用いて作成した標準曲線と比較することによって、抽出物中に含まれる cPA の濃度を決定した (図 5 (b))。以上の cPA の量を概算すると、湿重量 40g のウシ大腦から、約 2.1mg の cPA が精製されたことになる。

### (C) まとめ

一般に、脂質は哺乳動物の脳湿重量の 5~15%、乾燥重量の 65%を占め、脳は脂質を最も多く含む臓器の一つであると言える。実施例 2 では、40g のウシ大腦から約 7g の総脂質が抽出された。さらに、最終的には約 2.1mg の cPA 相当の脂質が検出された。精製途中でのロスを考えても、これは、脳中の全脂質重量の 0.1%以下に相当する値である。ラット脳中の主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルコリン (PC) の総脂質に対する割合がそれぞれ約 20%であることを考えると、cPA はこれらの約 1/200 以下に相当する微量な成分であるが、哺乳動物の脳中に cPA が存在することが証明された。

### 実施例 3 : ラット胎児脳由来の初代培養系神経細胞に対する環状ホスファチジン酸の作用 (生存率と神経突起への影響)

実施例 3 では、ラット胎児脳由来の初代培養系を用いて cPA が神経細胞の生存や神経突起の形成に及ぼす影響について解析した結果、cPA の新規な生理活性として、神経細胞への作用 (神経細胞の生存率の向上及び神経突起の伸長促進) が実証された。

#### (A) 材料及び方法

##### (A-1) ラット胎児脳海馬由来の初代培養神経細胞の調製と培養

材料として妊娠 16 日齢のスプラグドーレイ系ラットを用いた。ラットはエーテル麻酔をかけ、胎児を取り出し、実体顕微鏡下で脳全体を取り出した後、大脳皮質の内側にある海馬を摘出した。摘出した海馬を、15ml 遠心用チューブに集め、2.5%トリプシン 0.5ml に培養液を加えて 5ml とし、これを 37℃で 15 分インキュベートした。その後、3,000rpm で 15 分遠心後、上清を取り除き、培養液を 5ml 加えて、3,000rpm で 15 分遠心した。これをさらに 2 回繰り返し、3~5ml の培養液を加え、パスツールピペットでピペッティングし、次に注射針 (TERUMO NEEDLE (0.70x38mm) ; テルモ社製) を用いてピペッティングした。最後にセルストレーナー (FALCON Cell Strainer 70  $\mu$ m; FALCON 社製) に通して解離させた細胞を、プレートを用いて初代培養した。また、神経細胞が凝集を起こさないように培養できる培養液、プレートのコーティング方法を検討した。

なお、本試験に用いた cPA 誘導体は、実施例 1 に記載した方法に従って、基質として、オレオイル LPC を使用し、酵素源として、放線菌 *A. sp.* No. 362 由来の PLD を用いて合成したオレオイル cPA である。

#### (A-2) 神経細胞の生存率の測定

(A-1) に記載した方法で初代培養を行い、プレートに細胞を播いたのと同じ時に、それぞれ異なる密度の神経細胞にオレオイル cPA (5  $\mu$ m) を添加し、一定時間後に位相差顕微鏡を用いて、写真を撮り (倍率 20 倍、24 穴プレートの 1 ウェルにつき 5 枚の写真)、その写真上で細胞の生死を形態的に判別して生存率を算出した。

さらに、細胞生存率の上昇に最適な cPA の濃度を決定するために、神経細胞の生存率が最も高かった細胞密度 ( $3.0 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup>) で培養を行い、0.5、1.0、5.0 または 10.0  $\mu$ M のオレオイル cPA を細胞を播くのと同時に、細胞培養液に添加して同様に写真を撮り、その写真上で細胞の生死を判別した。

#### (A-3) 神経突起伸長の測定

神経突起の伸長に対する cPA の影響を調べるために、(A-1)に記載した方法で初代培養を行い、培養を始めてから 12、18、24 時間後に写真を撮り、それぞれの時間における細胞一個あたりの神経突起の平均長、および、神経突起を持つ細胞の数を画像解析ソフト (NIH Image 1.62) を用いて解析した。

#### (A-4) 細胞内シグナル伝達系の解析

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) の阻害剤である、ウォルトマンニン (Wortmannin; Sigma 社製) と LY294002 (Sigma 社製) をそれぞれ 10mM、50mM の濃度で DMSO に溶解後、PBS で希釈し、それぞれ最終濃度 30nM、10  $\mu$ M になるように細胞培養液に添加した。阻害剤は、cPA を加える 2 時間前に細胞培養液に添加し、前処理を行った。cPA の添加後 48 時間経た時点での細胞の写真を撮り、その写真上で細胞の生死を形態的に判別して生存率を算出した。

### (B) 結果

#### (B-1) 神経細胞初代培養条件に関する実験系の確立

予備実験として、様々な培養条件を検討し、神経細胞がプレートに接着するコーティング、培養液で実験した結果、培養液はハムの F-12 (Ham's F-12)、プレートのコーティングはポリ-L-リジン (Poly-L-lysine) またはポリ-L-オルニチン (Poly-L-ornithine) が適していたので、以後、ポリ-L-リジンがコーティングされたプレート (IWAKI MICROPLATE; IWAKI 社製) を用いた。また、血清中には cPA や LPA がすでに存在している可能性があるため、無血清培地を用いた。なお、血清の代わりに、増殖促進因子 (無血清培養補助因子) として N1 サプリメント (インシュリン 5  $\mu$ g/ml、トランスフェリン 5  $\mu$ g/ml、プロゲステロン 20nM、ブトレシン 100  $\mu$ M、亜セリン酸ナトリウム 30nM を含む; Sigma 社製) を添加した。

#### (B-2) ラット胎児海馬由来の初代培養神経細胞の生存率に対する cPA の作用

まず、5  $\mu$ M のオレオイル cPA を上記 (B-1) に記載した培養条件下の神経細胞

胞培養液に添加したところ、cPA 無添加のコントロールに比べて、細胞の生存が良好となり、さらに神経突起の伸長も観察された。そのときの代表的な細胞を図 6 に示す。次に、細胞の密度と生存率の関係について、さらに詳細に解析を行った。まず、 $3.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $7.5 \times 10^4$ 、あるいは、 $5.0 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> の密度で細胞を播いて、48 時間後の生存率を比較した結果、 $3.0 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播いた場合の細胞生存率が最も高かった (図 7 (a))。

次に、細胞密度を  $4.5 \times 10^5$ 、あるいは  $6.0 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> に高めた結果、細胞の生存率は  $3.0 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> の場合よりも低下した (図 7 (b))。従って、cPA が最も効果的に細胞の生存率を高めるためには、 $3.0 \times 10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> の細胞密度が適していることが明らかとなった。

次に、細胞生存率の上昇に最適な cPA の濃度を決定するために、細胞を播いた後、0.5、1.0、5.0、または  $10.0 \mu\text{M}$  の cPA を培地に添加して生死を判別した。その結果、cPA の濃度が  $1.0 \mu\text{M}$  の時に、細胞の生存に最も効果的であることが明らかとなった (図 8 及び図 9)。

### (B-3) 神経突起の伸長に対する cPA の作用

$5 \mu\text{M}$  のオレオイル cPA を細胞培養液に添加し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に写真を撮って、画像解析ソフト (NIH Image 1.62) で解析し、細胞 1 個当たりの神経突起の平均長を解析した。その結果、cPA 添加によって、24 時間後ではコントロールに比べ、2 倍の平均長が観察され、48 時間後 (1.5 倍) や 72 時間後 (1.2 倍) に比べて、効果が最も強く現れた (図 10 (a))。そこで、より早い時間で、cPA の神経突起伸長に関する作用を評価する必要があると考え、12 時間、18 時間、24 時間後の神経突起伸長に対する、各濃度の cPA の影響を調べた。その結果、cPA 濃度  $1.0 \mu\text{M}$  を添加したものの神経突起の伸びが、12 時間後の時点で、コントロールの約 1.7 倍になり、最大値を示した (図 10 (b))。この値は、 $50\text{ng/ml}$  (最適濃度) の NGF 添加に匹敵する値であった。

初代培養系において、神経突起はすべての神経細胞に満遍なく存在するのでは

なく、突起を有する細胞とそうでない細胞が混在する。そこで、神経突起を持つ細胞の割合についても cPA の効果を解析したところ、24 時間後では、cPA 濃度 1.0  $\mu$ M を添加したものにおいて、神経突起を有する細胞の割合が高かった。これは、NGF 添加時と比較しても高い値であった（図 1 1 及び図 1 2）。

#### (B-4) cPA による生存率上昇における細胞内シグナル伝達系の解析

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) の阻害剤である、ウォルトマンニン、あるいは LY294002 をそれぞれ培地に添加し、ウォルトマンニンによって生存率がコントロールレベル近くまで低下した。また、LY294002 の場合は、コントロール値以下の低い生存率を示した。細胞はつぶれて、変形したものが多かった。これは LY294002 n による細胞毒性が現れた結果とも考えられる。

以上の結果から、cPA による生存率上昇作用において、PI3K の活性を介した細胞内シグナル伝達系が関与していることが示唆された（図 1 3）。

#### (C) まとめ

上記結果より、cPA は 1.0  $\mu$ M の濃度においてラット海馬初代培養神経系細胞の生存率を向上させ、また神経突起の伸長を促進することが明らかとなった。今回の試験では、特に、cPA の長期作用として神経細胞伸長作用があることが明らかになり、cPA は長期的には神経細胞の分化を促進している可能性がある。

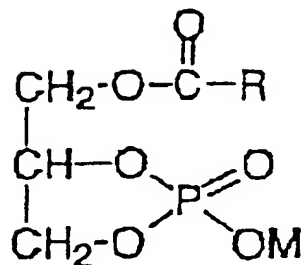
#### 産業上の利用の可能性

本発明により、一般式(I)で示される cPA 誘導体が、哺乳類の海馬由来の神経細胞の生存率を高め、神経突起の伸長を促進することが確認された。従って、本発明で用いる一般式(I)で示される cPA 誘導体が、痴呆、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン氏病、脳卒中、脳梗塞または頭部外傷などの神経障害治療剤として有用であることが明らかとなった。本発明によれば、神経細胞の生存率を高め、且つ、神経突起の伸長を促すことに

よって、脳神経細胞の死滅によって起こる種々の疾患の予防、治療、リハビリ等に非常に有効な神経障害治療剤及び予防剤が提供される。

## 請求の範囲

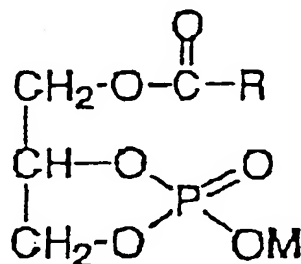
## 1. 一般式(I) :



(式中、Rは、炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。M は、水素原子又は対カチオンである。)

で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経細胞の生存促進のための薬剤。

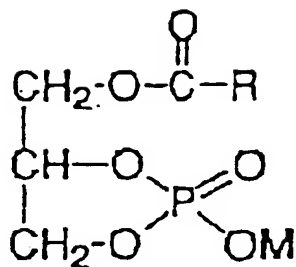
## 2. 一般式(I) :



(式中、Rは、炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。M は、水素原子又は対カチオンである。)

で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経細胞の伸長促進のための薬剤。

## 3. 一般式(I) :



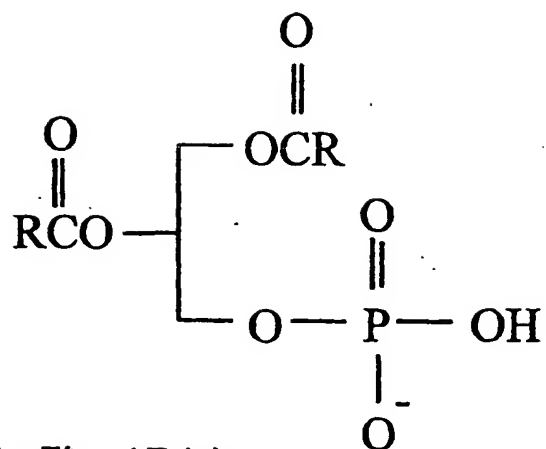
(式中、Rは、炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。M は、水素原子又は対カチオンである。)

で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、神経障害の治療及び／又は予防のための薬剤。

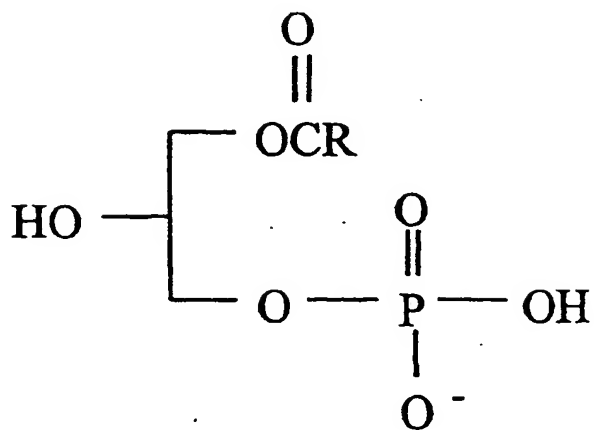
4. 神経障害が、痴呆、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン氏病、脳卒中、脳梗塞または頭部外傷から選択されることを特徴とする、請求項 1 から 3 の何れかに記載の薬剤。

5. 一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体が、1-オレオイル環状ホスファチジン酸である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の薬剤。

図 1

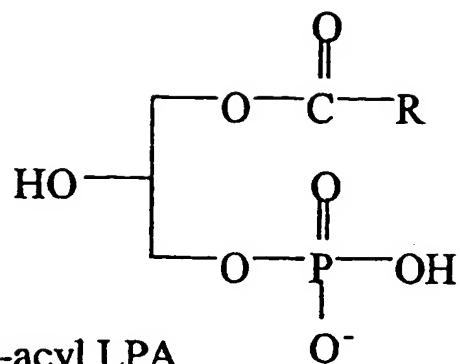


ホスファチジン酸 (PA)

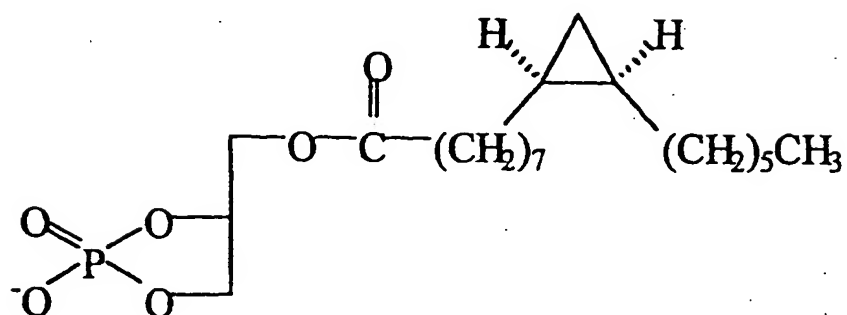


リゾホスファチジン酸 (LPA)

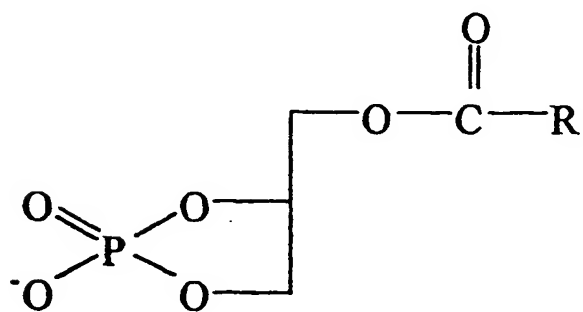
図 2



A. 1-acyl LPA



B. PHYLPA



C. 1-acyl cPA

図 3

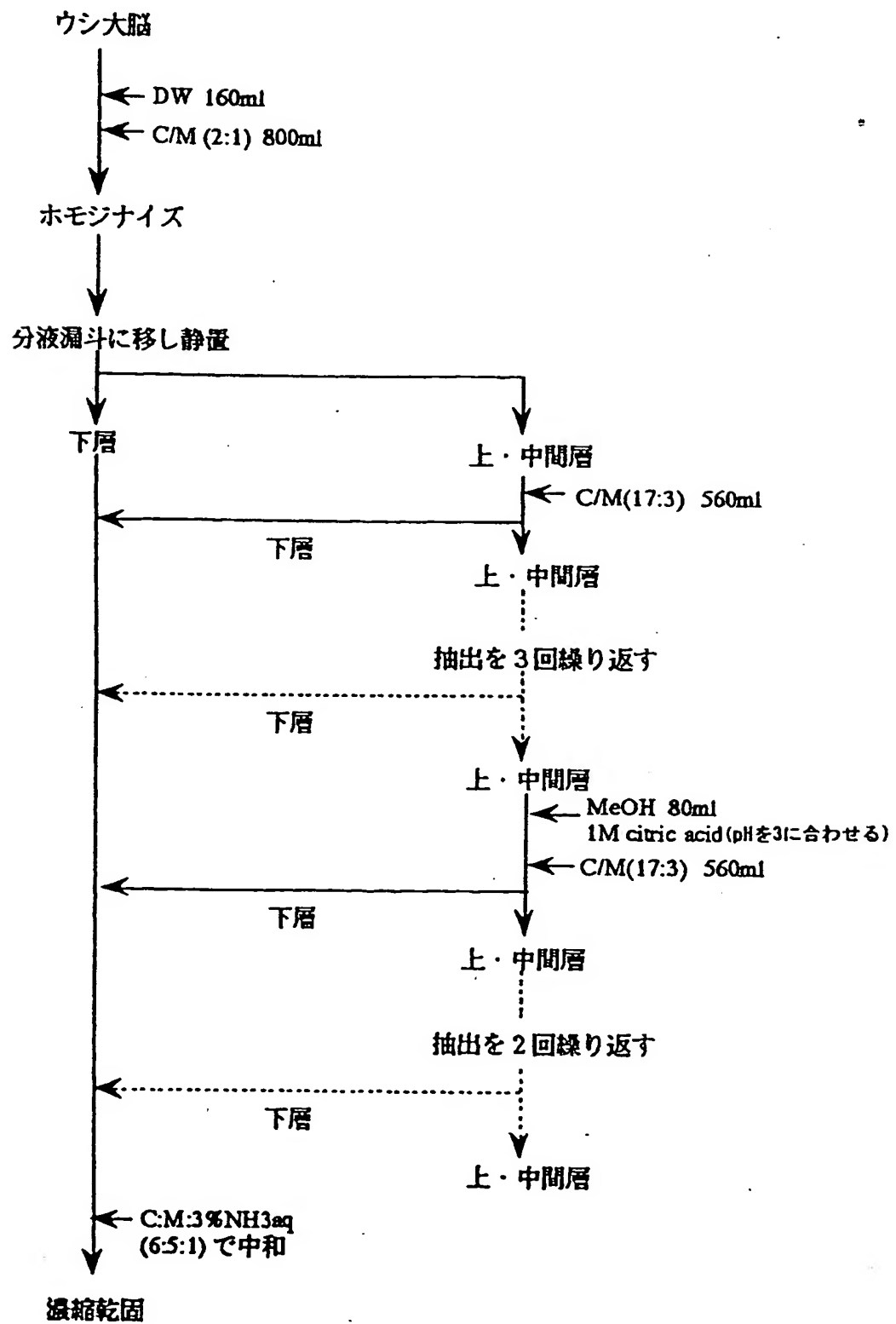
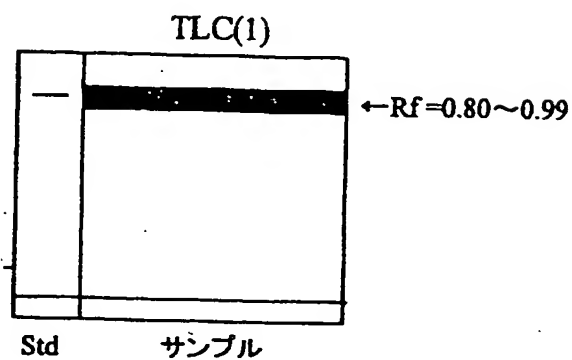


図 4

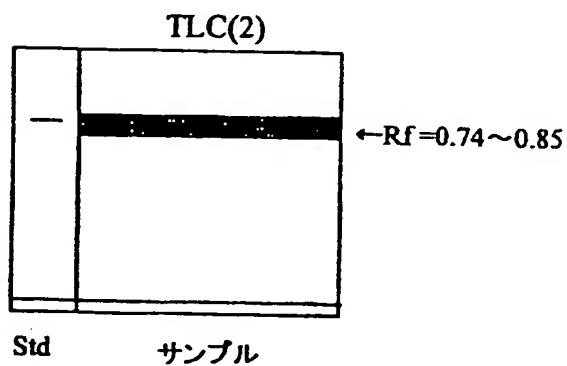
## 牛大脳皮質からの全脂質画分



溶媒 I : クロロホルム/メタノール / 7M NH<sub>3</sub>aq (12:12:1)



脂質の抽出

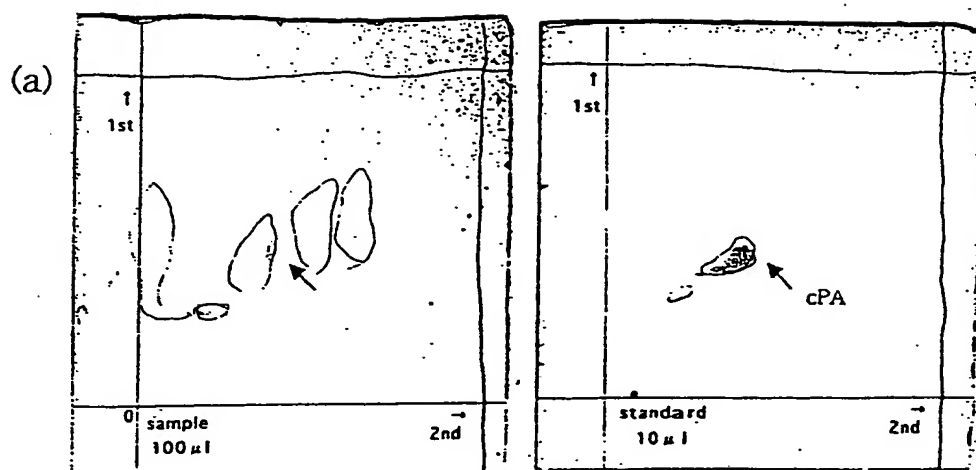


溶媒 II : クロロホルム/メタノール / 酢酸/水 (25:15:4:2)



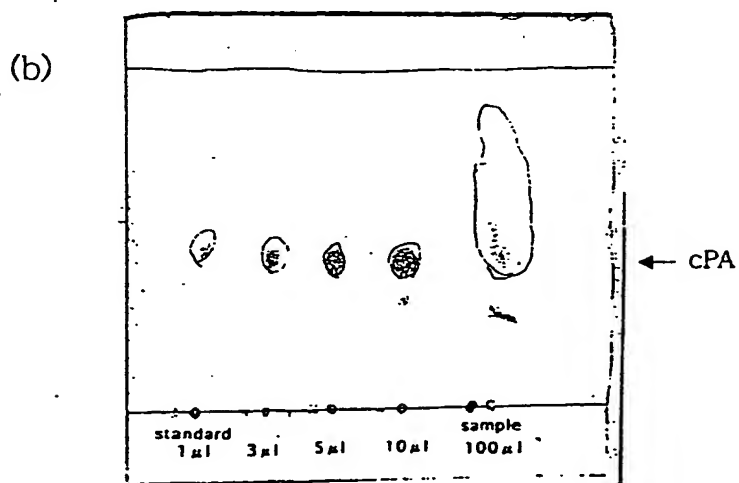
脂質の抽出

図 5



1次元 展開溶媒Ⅲ：クロロホルム／メタノール／水 (60:40:9)

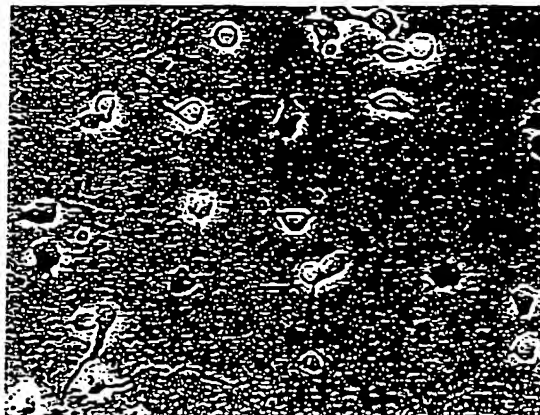
2次元 展開溶媒Ⅳ：クロロホルム／メタノール／酢酸／アセトン／水 (10:2:2:4:1)



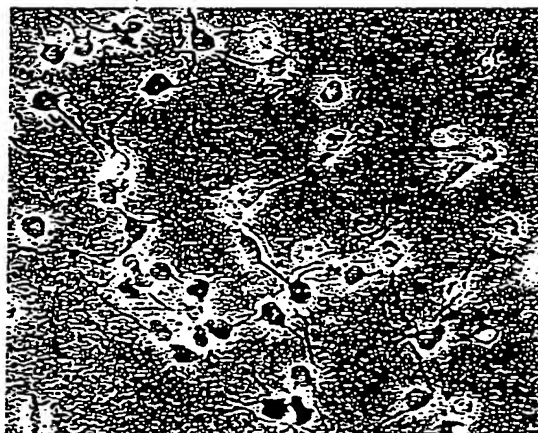
展開溶媒Ⅲ：クロロホルム／メタノール／水 (60:40:9)

図 6

(a)



(b)



(c)

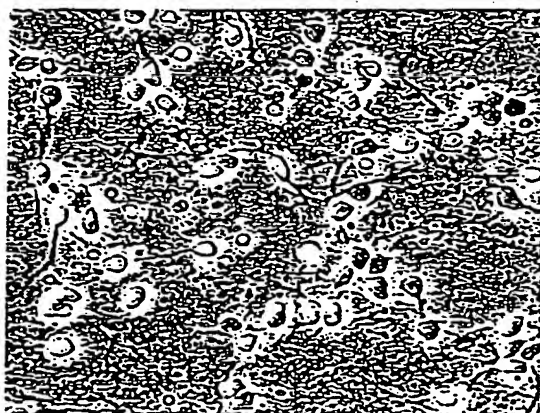
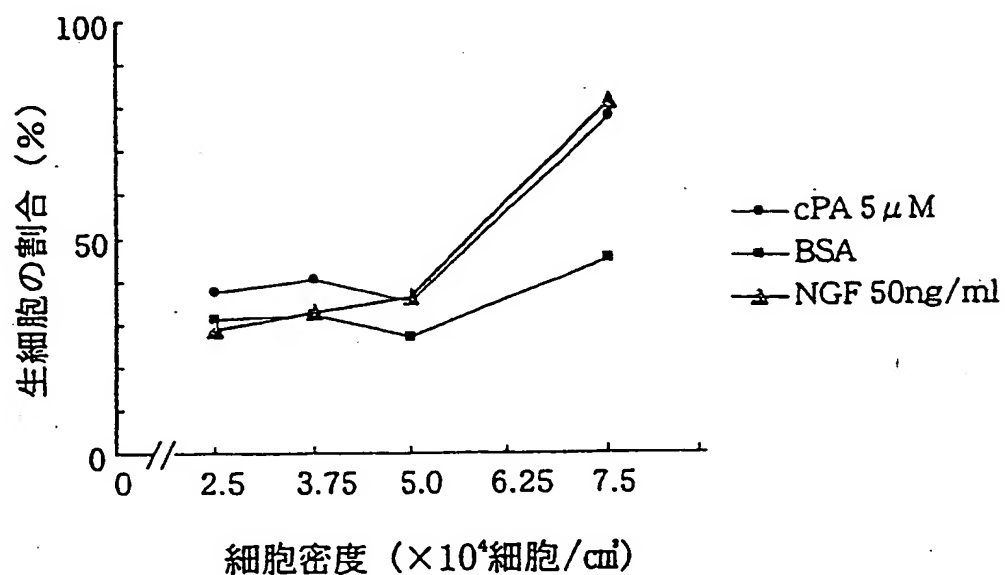


図7

## (a) 海馬ニューロンの生存に対するcPAの効果



## (b) 最適細胞密度の測定

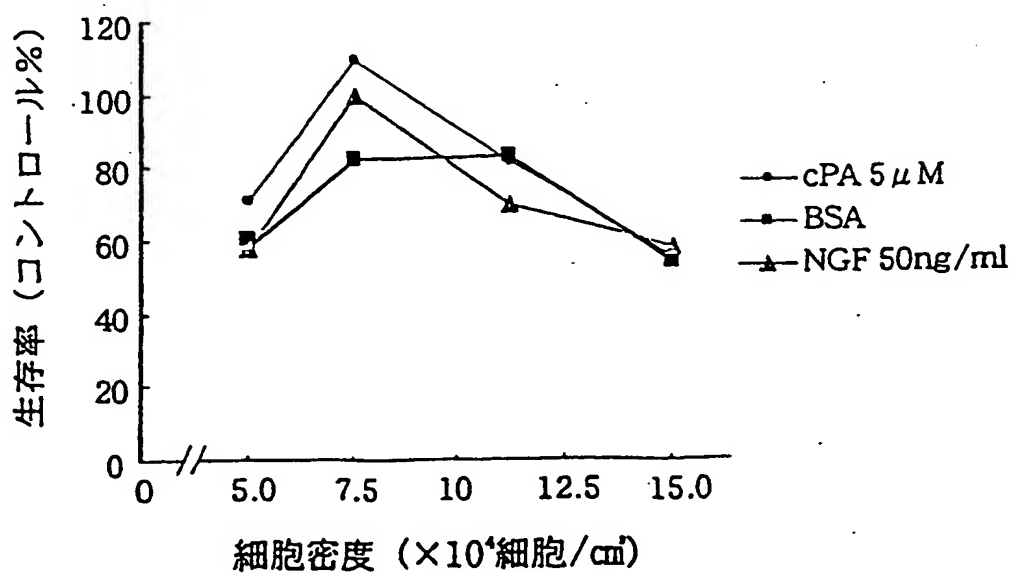


図8

## 海馬ニューロンの生存に対するcPAの効果

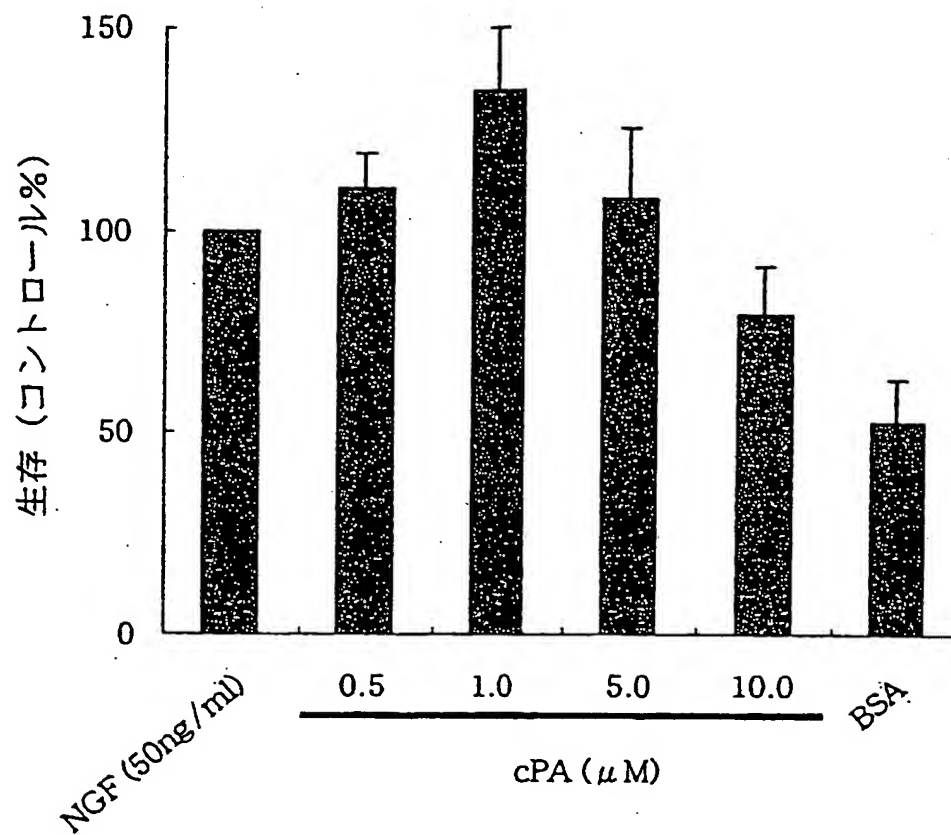
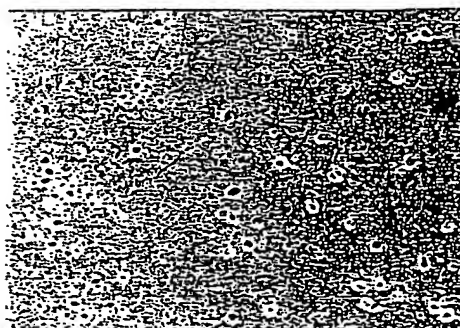
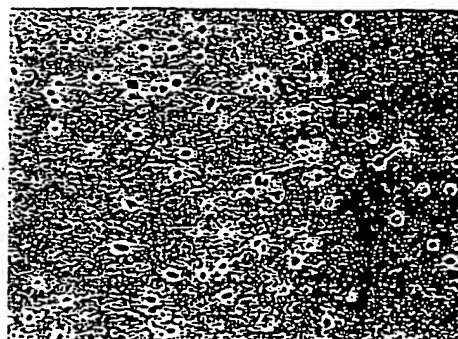


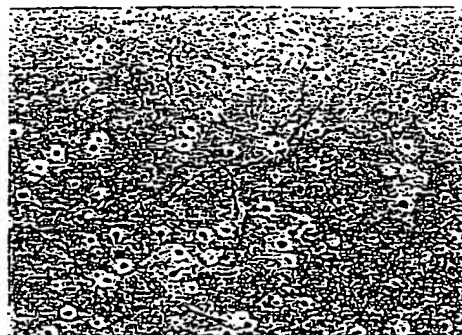
図 9



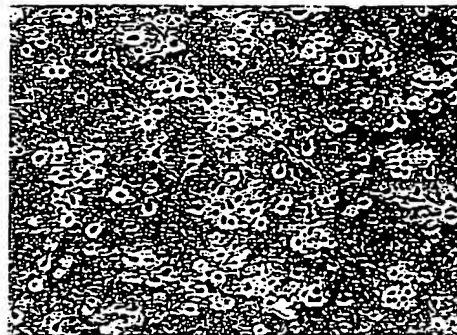
BSA



NGF 50ng/ml



cPA 0.5  $\mu$ M



cPA 1.0  $\mu$ M



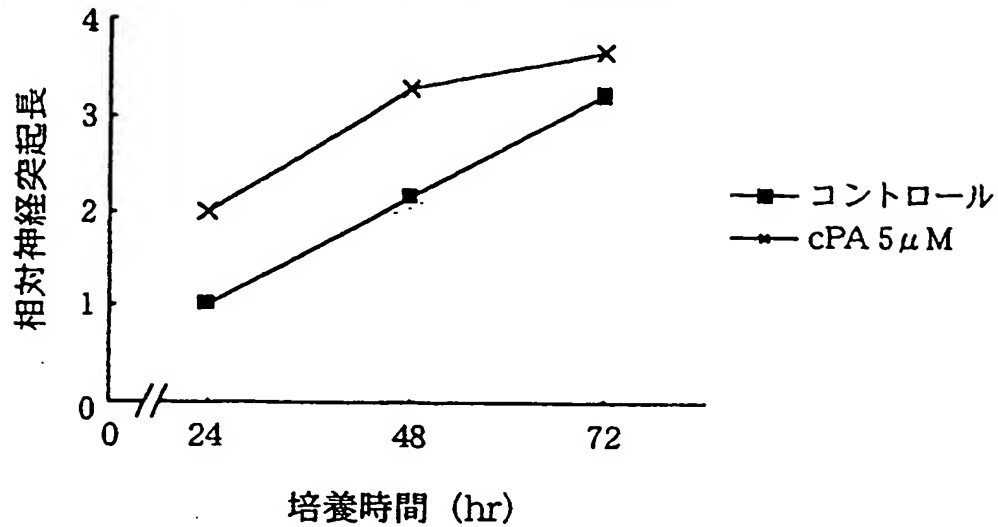
cPA 5.0  $\mu$ M



cPA 10.0  $\mu$ M

図10

(a) cPAの神経突起伸長に対する影響



(b) cPAの神経突起伸長に対する影響

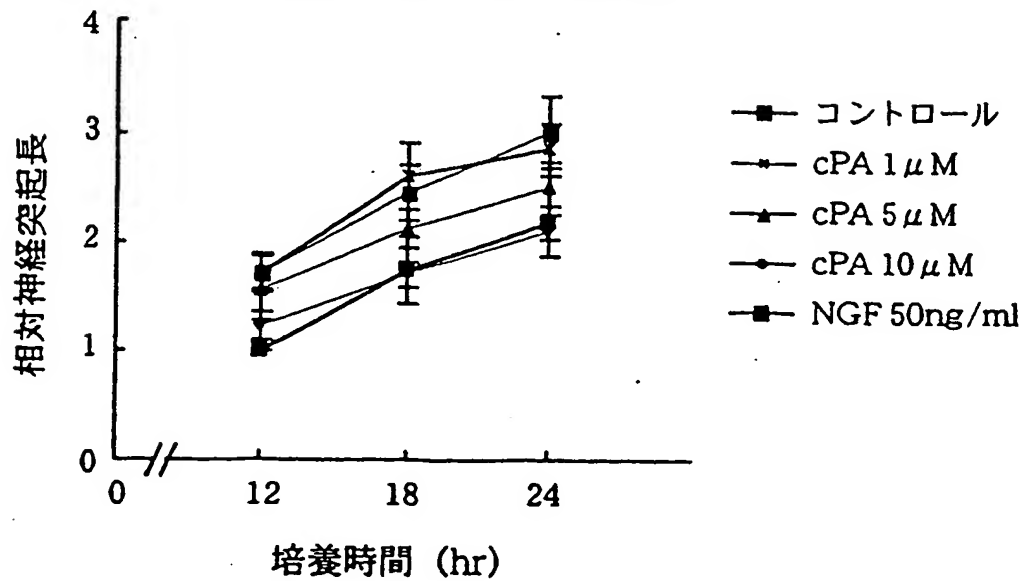
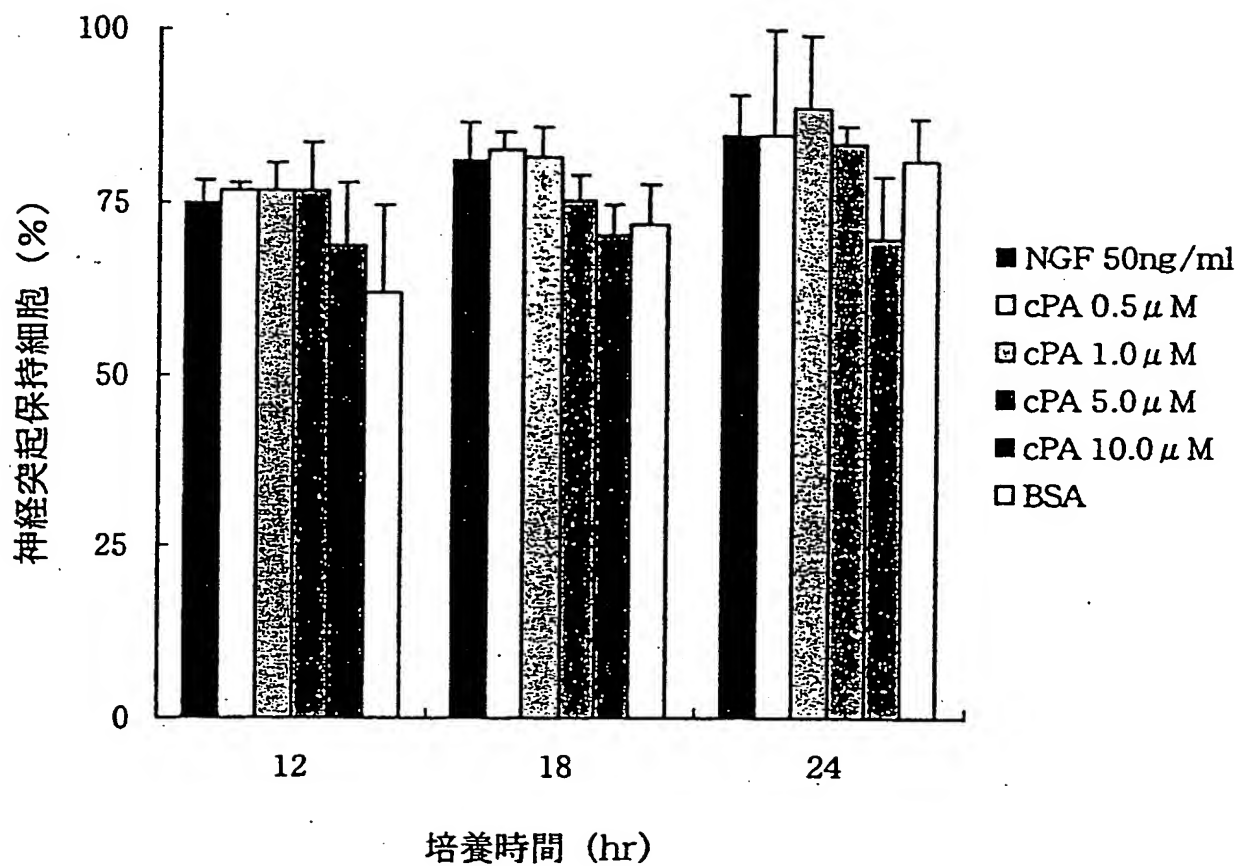
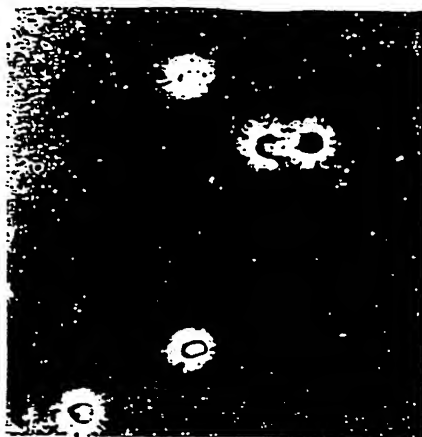


図11



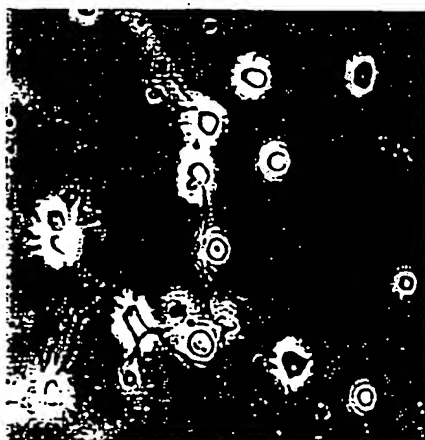
☒ 12



BSA



NGF 50ng/ml



cPA 1.0  $\mu$ M

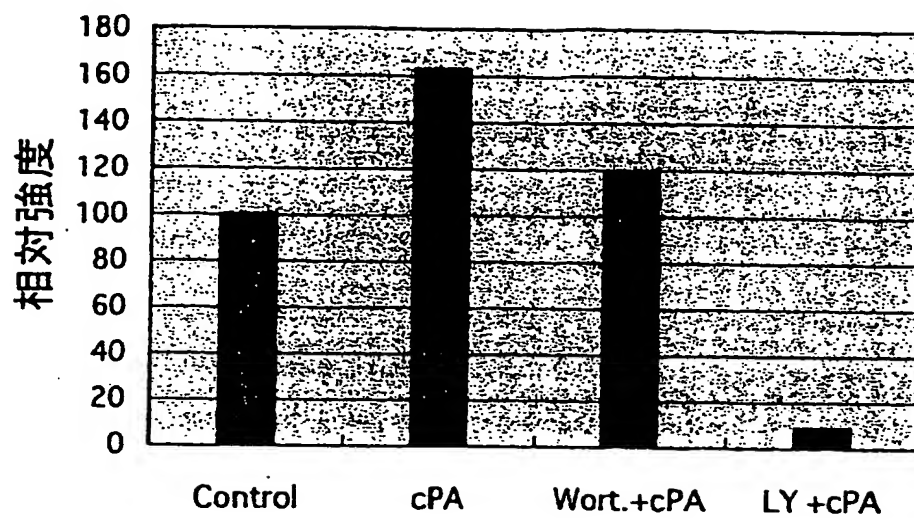


cPA 5.0  $\mu$ M



cPA 10.0  $\mu$ M

図 13



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03658

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/661, A61P25/00, 25/16, 25/28, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/66-668, A61P25/00-36, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/57865 A2 (Yeda Research and Development Co., Ltd.) 05 October, 2000 (05.10.00), Particularly, refer to compound iii stated in Claims 1 and 13 & AU 3451700 A	1-5
X Y	JP 7-149772 A (Sagami Chemical Research Center), 13 June, 1995 (13.06.95), Particularly, page 6 (Family: none)	3-5 1-2
X Y	WO 99/47101 A2 (LXR Biotechnology, Inc.) 23 September, 1999 (23.09.99), Particularly, refer to the compound expressed by general formula (XI) shown on p.14 of the description; page 43, line 33 to page 45, line 15 & EP 1069895 A2	3-4 1-2, 5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 June, 2002 (10.06.02)

Date of mailing of the international search report  
25 June, 2002 (25.06.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/03658

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/661, A61P25/00, 25/16, 25/28, 43/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/66-668, A61P25/00-36, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/57865 A2 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 2000. 10. 05 特に請求の範囲 1、及び、請求の範囲 13 に記載の化合物iii等を 参照。 &AU 3451700 A	1-5
X Y	JP 7-149772 A (財団法人相模中央化学研究所) 1995. 06. 13 特に第 6 頁等を参照。 (ファミリーなし)	3-5 1-2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 06. 02

国際調査報告の発送日

25.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ



4 P

3040

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 99/47101 A2 (LXR BIOTECHNOLOGY, INC.) 1999.09.23 特に明細書第14頁に記載の一般式 (X I) で表される化合物、及び、第43頁第33行～第45頁第15行等を参照。 &EP 1069895 A2	3-4 1-2, 5